

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850191

研究課題名(和文) 犬の炎症性結直腸ポリープの病態解析：Toll様受容体の機能異常と免疫寛容の破綻

研究課題名(英文) A study on the innate immune response in the colorectal mucosa of dogs with inflammatory colorectal polyps: analysis of toll-like receptors expression and function

研究代表者

大田 寛(Ohta, Hiroshi)

北海道大学・獣医学研究科・講師

研究者番号：50431333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：犬の炎症性結直腸ポリープ(ICRPs)のポリープ病変部におけるTLR2およびTLR4 mRNAの局在解析をIn situ hybridization法にて行った。その結果、ICRPsのポリープ病変部にてTLR2およびTLR4のmRNAは結腸上皮細胞、炎症細胞にてその発現を認めた。また、健康な犬の結腸と比較してそれらのmRNA発現が増加していた。加えて、ICRPs症例の結直腸粘膜を培養し、各種TLRリガンドで刺激したところ、TLR2およびTLR4リガンド刺激でTNF- α mRNAが、TLR9リガンド刺激でIL-1 β mRNAの発現が健康犬よりも増加していた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the expression and function of Toll-like receptors (TLRs) in the colorectal mucosa of miniature dachshunds (MDs) with inflammatory colorectal polyps (ICRPs). By using in situ hybridization method, we examined the expression and localization of TLR2 and TLR4. As a result, TLR2 and TLR4 mRNA were localized to the colorectal epithelium and inflammatory cells in the inflamed colorectal mucosa of dogs with ICRPs. In addition, we examined the effects of different TLR (TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9) ligands on pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α) gene expression in ex vivo-cultured colorectal samples from MDs with ICRPs. After 4-hour incubation, TNF- α mRNA expression in the TLR2- or TLR4-stimulated colorectal samples, and IL-1 β mRNA expression in the TLR9-stimulated colorectal samples from MDs with ICRPs were higher than healthy dogs.

研究分野：獣医学・臨床獣医学

キーワード：犬 炎症性結直腸ポリープ Toll-like receptor 自然免疫 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

ミニチュア (M)・ダックスフントの炎症性結直腸ポリープ (Inflammatory colorectal polyps; ICRPs) は、下部大腸における多発性の炎症性ポリープ形成を特徴とし、時に内腔を占拠するような大型のポリープ形成を伴う。現時点では明らかな病原因子は特定されておらず、ステロイドを主体とした免疫抑制療法が治療効果を示すことから、新たな炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease; IBD) の一つであると考えられている。

我々はこれまでの研究で ICRPs のポリープ病変部では、消化管マクロファージ由来の炎症性サイトカインの発現や、ヒトの IBD の発症に重要なサイトカインである Interleukin-17 の発現が顕著に増加していることを明らかにしてきた。これらの結果は、ICRPs のポリープ病変部では、自然免疫系、獲得免疫系のいずれも過剰に活性化していることを示しており、糞便中の抗原 (細菌抗原等) に対する免疫寛容の破綻がその背景あることを示唆するものである。

ヒトの IBD 患者の腸粘膜では細菌抗原を特異的に認識する受容体である Toll 様受容体 (Toll-like receptor ; TLR) の発現が上昇しており、腸内細菌叢に対して過剰な免疫反応を起こす一因と考えられている。また、IBD 患者の腸粘膜上皮や消化管マクロファージに発現している TLR は、健常者のものと比べ細菌抗原に対する応答が亢進しており、過剰に炎症性サイトカインを発現することも明らかになっている。これらのことから、ICRPs のポリープ病変形成においても TLR の発現上昇や機能異常が関与していることが予想される。

2. 研究の目的

これまでの研究で、ICRPs 症例のポリープ病変部では細菌抗原に対する過剰な免疫応答が生じていることが疑われる。過剰な免疫応答の背景として ICRPs 症例犬の結直腸粘膜では TLR の機能異常が存在

することが予想される。そこで本研究では、ICRPs 症例の結直腸粘膜における TLR の発現解析、TLR を発現する細胞の同定・単離を行い、最終的に ICRPs 症例の TLR の機能解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ICRPs 症例の結直腸粘膜における TLR2, TLR4 の局在および発現解析

In situ hybridization 法を用いて、健常犬ならびに ICRPs 症例犬の結直腸粘膜における TLR2 および TLR4 mRNA の局在解析ならびに発現量解析を行う。TLR2 および TLR4 mRNA 発現量はドットの数ならびにサイズとして検出されるため、それらの定量を行う。定量化した発現量を健常犬の発現量と比較する。

(2) ICRPs 症例の結直腸粘膜の ex vivo 培養による TLRs の刺激試験

ICRPs 症例の結直腸粘膜より採取した粘膜組織を、TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 のリガンドで 4 時間刺激し、刺激前後の炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β) の発現量を定量的リアルタイム PCR 法で解析する。炎症性サイトカインの遺伝子発現量を健常ビーグル犬、健常 M・ダックスフント由来の粘膜組織における発現量と比較する。

(3) ICRPs 症例犬の結直腸粘膜における COX-2 発現と TLR 発現との関連性の解析

ICRPs 症例の臨床研究において、ICRPs 症例の一部では選択的 COX-2 阻害薬が奏効する症例が存在することが報告されており、COX-2 が ICRPs の病態形成に関与することが疑われている。また、様々な粘膜上皮細胞に発現する TLR が細菌抗原で刺激されることで COX-2 の発現上昇が生じることも報告されている。これらの背景より、ICRPs 症例の結直腸粘膜における COX-2 の発現解析ならびに TLRs の発現との相関を解析した。COX-2 の発現解析はリアルタイム PCR 法ならびに免疫組織化学法で行う。

(4) ICRPS 症例犬の結直腸粘膜における TJ 蛋白質クローディングおよびアドヘレンスジャンクションの蛋白質発現解析

ヒトの IBD 患者の結腸粘膜において発現変動が報告されている TJ 蛋白質クローディングおよびアドヘレンスジャンクションの蛋白質について、ICRPs 症例犬の結直腸粘膜における局在および発現量を、イムノプロット法ならびに免疫組織化学法にて解析し、健常犬のものと比較する。

4. 研究成果

(1) ICRPs 症例の結直腸粘膜における TLR2, TLR4 の局在および発現解析

In situ hybridization 法による局在および発現解析の結果、TLR2 および TLR4 の mRNA は結腸粘膜上皮細胞ならびに炎症細胞にてその発現を認めた。また、TLR2 および TLR4 の mRNA の発現量を健常な犬の結腸と比較したところ、TLR2 および TLR4 の mRNA の発現が有意に増加していることが明らかとなった。一方で、ICRP 症例の肉眼的に正常な結腸粘膜での TLR2 および TLR4 の遺伝子発現は健常犬のものと差が認められず、ポリープ病変に局限した TLR2 および TLR4 の遺伝子発現の上昇であることが明らかとなった。このことから、ICRPs 症例のポリープ病変部においては、浸潤した炎症細胞のみでなく、粘膜上皮細胞においても TLR2 および TLR4 の mRNA の発現が上昇していることが明らかとなり、粘膜上皮細胞の過剰に発現した TLR4 が ICRPs の病態形成に関与していることが示唆された。

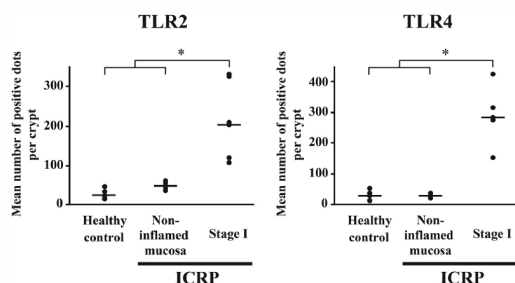


図1. ICRPs 症例のポリープ病変部の粘膜上皮細胞 (Stage I) では ICRPs 症例の非病変部結腸ならびに健常犬の結腸と比較して TLR2 および TLR4 の mRNA 発現量が増加していた。(雑誌論文 2 より引用)

(2) ICRPs 症例の結直腸粘膜の ex vivo 培養による TLRs の刺激試験

ICRPs 症例の内視鏡下粘膜生検組織を培養し、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9 の各リガンドで 4 時間の刺激を行った。リガンド刺激前後の結直腸粘膜組織における炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β) 遺伝子の発現量を解析し健常犬のものと比較した。解析の結果、TLR2 および TLR4 のリガンドによる刺激により、培養組織における TNF- α の遺伝子発現量が健常犬と比較して増加していた。また、TLR9 のリガンドによる刺激により、IL-1 β の遺伝子発現量の増加が認められた。これらより、ICRPs 症例の結直腸粘膜においては、TLR2、TLR4 および TLR9 の細菌抗原に対する反応性が上昇しており、ICRPs の病態形成に関与していることが示唆された。

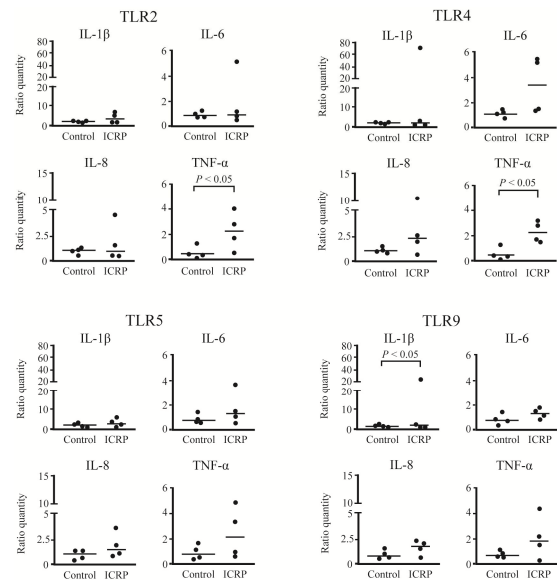


図2. ICRPs 症例の結直腸粘膜を ex vivo 培養し、各 TLR リガンドで刺激したところ、ICRPs の結直腸粘膜では健常犬と比較して TLR2 および TLR4 リガンド刺激で TNF- α 遺伝子の有意な増加が、TLR9 リガンド刺激で IL-1 β 遺伝子の有意な増加が認められた。(雑誌論文 1 より引用)

(3) ICRPs 症例犬の結直腸粘膜における COX-2 発現と TLR 発現との関連性の解析

ICRPs 症例の結直腸粘膜においては COX-2 mRNA の発現が上昇しており、COX-2 mRNA と TLR4 mRNA との間に強い相関が認められた。更

に、局在解析の結果、COX-2 蛋白質と TLR4 mRNA が共に結腸粘膜上皮細胞および炎症細胞に発現していることが明らかとなった。

(4) ICRPS 症例犬の結直腸粘膜における TJ 蛋白質クローディングおよびアドヘレンスジャンクションの蛋白質発現解析

ICRPs 症例のポリープ病変部におけるクローディングおよびアドヘレンスジャンクションの蛋白質の発現解析および局在解析を行ったところ、健常犬における発現量との有意な差は認められなかった。

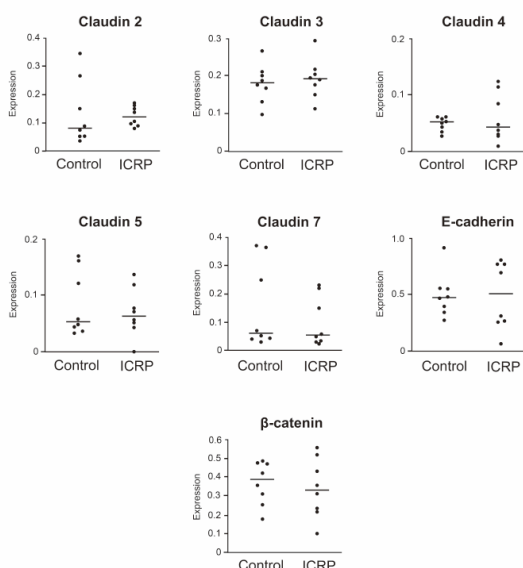


図3 . ICRPs 症例の結直腸粘膜におけるクローディング、E-cadherin, ならびにβ-catenin の蛋白質発現をイムノプロット法にて解析したところ、健常犬 (Control) と比較して有意な発現量の変化を認めなかった。(雑誌論文3より引用)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Yokoyama N, Ohta H, Kagawa Y, et al. (他8名) Stimulation of colorectal biopsies from miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps with toll-like receptor ligands: A pilot study. *Vet Immunol Immunopathol.* 査読有. In press.
2. Yokoyama N, Ohta H, Kagawa Y, et al. (他9名) Expression of apical junction complex proteins in colorectal mucosa of miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. *J Vet Med Sci.* 査読有. 79:456-463, 2017. Doi: 10.1016/j.jcpa.2016.10.010.

3. Yokoyama N, Ohta H, Yamazaki J, et al. (他9名) Localization of TLR2 and TLR4 mRNA in the colorectal mucosa of miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. *J Comp Pathol.* 査読有. 156:183-190, 2017. doi: 10.1016/j.jcpa.2016.10.010.

〔学会発表〕(計6件)

横山 望、大田 寛、賀川 由美子、他7名、炎症性結直腸ポリープ症例の結直腸粘膜組織を用いた Toll 様受容体刺激による炎症性サイトカイン発現の評価、第13回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2017年2月18日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

長谷川 純也、大田 寛、横山 望、他8名、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープにおける COX-2 発現と Toll-like receptor との関連性の解析、第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月7日、日本大学生物資源科学部(神奈川県・藤沢市)。

Nozomu Yokoyama, Hiroshi Ohta, Noboru Sasaki 他3名、Localization of toll-like receptor-2 and -4 in the colorectal mucosa of miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps, Asian Meeting of Animal Medicine Specialties 2015, 2015年11月1日、Kuala Lumpur (Malaysia)。

横山 望、大田 寛、賀川 由美子、他9名、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープ症例の結直腸粘膜における Toll-like receptor 2,4 の局在解析、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月7日、北里大学(青森県・十和田市)。

大田 寛、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープ病態：炎症性サイトカインの発現解析を中心に、第11回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2015年2月21日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

横山 望、大田 寛、森田 智也、他5名、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープ症例の結直腸粘膜における claudin の蛋白質発現解析、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月11日、北海道大学(北海道・札幌市)。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大田 寛 (Ohta Hiroshi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・講師

研究者番号：50431333

(4)研究協力者

横山 望 (Yokoyama Nozomu)

北海道大学・大学院獣医学研究科・大学院

生